

Министерство образования и науки РФ

ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

УДК

№ госрегистрации

Инв. №

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по науке

_____ Кружаев В.В.

«___» _____ 2013

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

В рамках выполнения п. 1.2.2.3 Плана реализации мероприятий Программы развития
УрФУ на 2010-2020 годы

ПО ТЕМЕ:

Генетическая структура популяций боррелий на территории России

(Заключительный)

Договор возмездного оказания услуг (выполнения работ, на создание произведения)
№ 1.2.2.3/21

Зав. кафедрой

(подпись, дата)

Киселева И.С.

Научный руководитель

(подпись, дата)

Ковалев С.Ю.

Исполнитель

(подпись, дата)

Мухачева Т.А.

Екатеринбург 2013

Реферат

1. **ФИО автора:** Мухачева Татьяна Александровна

Author: Mukhacheva Tatyana Alexandrovna

2. **Аннотация:**

Иксодовый клещевой боррелиоз – природно-очаговое заболевание, возбудителем которого являются спирохеты рода *Borrelia*. На территории таежной зоны России регистрируется по меньшей мере 3 геновида боррелий, патогенных для человека, – *B.afzelii*, *B.garinii* и *B.miyamotoi*. Кроме того, в последнее время внутри *B.garinii* был выделен новый вид *B.bavariensis*. Целью данного исследования стало проведение молекулярно-генетической характеристики боррелий на территории России. В ходе исследования были типированы 50 штаммов и изолятов ДНК боррелий (собранных в разных регионах страны от Санкт-Петербурга до Владивостока) с помощью общепринятого метода мультилокусного сиквенс-типирования (MLST). При этом было получено 27 новых сиквенс-типов. Филогенетический анализ позволил предположить азиатское происхождение *B.afzelii* и *B.bavariensis*, а также выявил сложную филогенетическую структуру *B.garinii*. Наши данные подтверждают гипотезу, согласно которой ключевым фактором в распространении боррелий является видовой состав прокормителей клещей, к которым адаптирован конкретный вид. В связи с невозможностью проводить типирование смешанных образцов нами была дополнена ранее разработанная система дифференциации видов боррелий (*B.afzelii*, *B.bavariensis*, *B.garinii*, *B.miyamotoi*) методом ПЦР в реальном времени. Её применение позволило значительно повысить эффективность исследования и дало возможность выбора интересующих видов боррелий для анализа.

Summary:

Lyme disease is a natural focal infection caused by spirochetes of the genus *Borrelia*. In Russia, at least three pathogenic *Borrelia* genospecies are common: *B.afzelii*, *B.garinii*, and *B.miyamotoi*. Additionally, a new species, *B.bavariensis*, was recently characterized. The aim of the present study was to carry out a molecular genetic analysis of *Borrelia* sp. in Russia. Fifty strains and DNA isolates of *Borrelia* from different regions of Russia (from St Petersburg to Vladivostok) were typed according to the multilocus sequence-typing (MLST) scheme. Twenty-

seven of them were new and not presented in the international database. Phylogenetic analysis allowed to suggest the Asian origin of *B.afzelii* and *B.bavariensis*, as well as revealed a complex phylogenetic structure of *B.garinii*. Our data support the hypothesis that a key factor in the spread of *Borrelia* species may be adaptation to different vertebrate hosts such as rodents and birds. As it was impossible to type mixed *Borrelia* samples, we have improved our system of differentiation of *Borrelia* species (*B.afzelii*, *B.bavariensis*, *B.garinii*, and *B.miyamotoi*) by real-time PCR. It allowed us to carry out the analysis more efficiently and to select species of interest for the further examination.

3. **Ключевые слова:** боррелии, клещ, генетическое разнообразие, мультилокусное типирование, популяция

Keywords: *Borrelia*, ticks, genetic diversity, multilocus sequence typing, population

4. **Тема отчета:** Генетическая структура популяций боррелий на территории России.

Report's theme: Genetic structure of *Borrelia* sp. populations in Russia.

Содержание

Обозначения и сокращения	5
Введение	6
Основная часть.....	8
Заключение.....	15
Список использованных источников.....	16

Обозначения и сокращения

MLST – multilocus sequence typing (мультилокусное сиквенс-типирование)

ST – sequence type (сиквенс-тип)

ИКБ – иксодовый клещевой боррелиоз

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

рРНК – рибосомальная РНК

Введение

Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) - природно-очаговая трансмиссивная инфекция, возбудителем которой являются спирохеты комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*, передающиеся человеку при укусе клещей рода *Ixodes*. Боррелии этого комплекса распространены по всему северному полушарию и встречаются в 30 странах Северной и Южной Америки, Европы и Азии. В России эндемичные по ИКБ регионы протянулись от Балтийского моря до Дальнего Востока и Сахалина.

На классификацию боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi* s.l. большое влияние оказал предложенный в 2008 году метод мультиклокусного сиквенс-типирования (MLST), заключающиеся в анализе распределения и частоты сиквенс-типов (ST) и хорошо зарекомендовавший себя как инструмент изучения генетической структуры популяций и процессов эволюции многих возбудителей бактериальной природы. Кроме того, была создана и поддерживается международная база данных (<http://borrelia.mlst.net/>), содержащая в себе последовательности выделенных сиквенс-типов (элементарные единицы анализа - объединенные последовательности 8 фрагментов генов, отличающиеся друг от друга минимум на один нуклеотид), а также эпидемиологические данные и программное обеспечение для анализа. Это делает MLST наиболее перспективным и объективным методом изучения популяций боррелий. Однако, среди более 1300 штаммов *Borrelia burgdorferi* s.l., чьи последовательности представлены в данной базе, только три были выделены на территории России и депонированы японскими исследователями. Таким образом, несмотря на то, что таежная зона России является самым большим очагом ИКБ и служит связующим звеном между Европой и Азией, в России данный подход в изучении молекулярной эпидемиологии ИКБ не применяется. Поэтому зарубежные исследователи подчеркивают необходимость изучения штаммов с территории России, что является ключевым пунктом в понимании эволюции и распространения боррелий по Евразии.

Целью настоящей работы стало изучение молекулярно-генетических особенностей бактерий рода *Borrelia* на территории России методом MLST. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) пополнить созданный банк штаммов боррелий, циркулирующих в природных очагах разных регионов России (преимущественно Урала, по возможности – более удаленных регионов);

2) охарактеризовать выделенные штаммы, а также изоляты из природы (выделенные из клещей) с помощью MLST, провести сравнительный анализ территорий по генетическому разнообразию боррелий, используя международную специализированную базу данных;

3) применить разработанную нами ранее диагностическую систему дифференциации видов боррелий (с помощью методов полимеразной цепной реакции в реальном времени) для повышения эффективности проведения мультилокусного типирования за счет элиминации смешанных образцов и возможности типирования желаемых видов.

Основная часть

В настоящее время в Лаборатории молекулярной генетики ИЕН УрФУ, совместно с ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области", на протяжении ряда лет (с 2006 года) проводится ежегодный мониторинг природных очагов ИКБ и клещевого энцефалита на территории Свердловской области. К 2013 году был создан банк штаммов боррелий (24 штамма), изолированных путем культивирования на среде BSK-H из клещей на территории Свердловской области, Пермского края и Архангельской области.



Рис.1. Географическое расположение мест отлова клещей для изоляции и анализа образцов боррелий.

Видовое и популяционное разнообразие возбудителей ИКБ – спирохет комплекса *Borrelia burgdorferi* s.l. – широко изучается с помощью различных молекулярно-генетических подходов. Наиболее распространенным и доступным из них является секвенирование отдельных генов или их фрагментов, выбранных в качестве генетических маркеров. Однако, исследование одного локуса часто дает ненадежные результаты, способные приводить к значительным противоречиям при построении филогении на

основе разных генов. В связи с этим в 2008 году [4] была предложена оптимальная схема мультилокусного типирования (multilocus sequence typing, MLST) боррелий, включающая анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов восьми консервативных генов домашнего хозяйства. Объединенные последовательности этих генов, отличающиеся друг от друга минимум на один нуклеотид, представляют собой сиквенс-тип (ST), являющийся единицей филогенетического анализа. Для стандартизации эпидемиологических исследований, а также понимания вопросов эволюции боррелий была создана международная база данных (*Borrelia burgdorferi* Database MLST), содержащая сведения о сиквенс-типах (STs), их последовательности, а также программное обеспечение для анализа.

В настоящем исследовании были определены нуклеотидные последовательности фрагментов восьми генов «домашнего хозяйства» общей длиной 4785 н.п. (согласно общепринятой методике MLST) для 20 штаммов боррелий, а также 30 клещевых изолятов, собранных в разных регионах России от Санкт-Петербурга до Владивостока (в дальнейшем штаммы и изоляты будут именоваться штаммами) (Таблица 1, Рис.1). Филогенетический анализ проводился с помощью программы MEGA5. Для сравнения были взяты последовательности сиквенс-типов боррелий из вышеупомянутой международной базы данных (<http://borrelia.mlst.net/>).

Полученные последовательности 50 штаммов принадлежали трем видам боррелий: *B.afzelii* (18 последовательностей), *B.garinii* (19) и недавно предложенному виду *B.bavariensis* (бывший ospA серотип 4 *B.garinii*) (13). При анализе было выявлено 27 новых сиквенс-типов, не представленных в базе данных (всего 38 штаммов, от одного до пяти на каждый ST). Последовательности 12 штаммов принадлежали установленными сиквенс-типами: ST128 (Япония, Китай, Монголия), ST154 (Китай), ST364 (Япония), ST372 (Япония), ST374 (Россия, Московская область). Последовательности 24 штаммов были зарегистрированы нами в международной базе данных MLST, при этом новым сиквенс-типам были присвоены номера ST431-ST446.

B.afzelii из всех изученных областей России, за исключением Дальнего Востока, формировали особую группу, в которую попал один штамм, выделенный в Китае (Рис. 2). Единственный дальневосточный штамм кластеризовался с другой группой, широко распространенной на территории Китая и Японии. Таким образом, можно говорить о филогенетической близости *B.afzelii*, распространенных в России, к азиатским, нежели к европейским штаммам.

Таблица 1. Географическое происхождение типированных штаммов

Число штаммов	Происхождение	Число штаммов	Происхождение
3	Алтай	1	Санкт-Петербург
1	Омутнинск (Кировская обл.)	1	Сысерть (Свердловская обл.)
6	Котлас (Пермский край)	1	Североуральск (Свердловская обл.)
9	Кунгур (Пермский край)	16	Екатеринбург
1	Курган	2	Тобольск (Тюменская обл.)
5	Чердынь (Пермский край)	3	Томск
1	Владивосток	50	Всего

Аналогичная ситуация наблюдается и для вида *B.bavariensis* (бывший 4 серотип *B.garinii*, прототипный штамм РВи), первоначально выделенного в Германии [5] и имеющего широкий ареал [6]. Так как наибольшее разнообразие этих боррелий и их встречаемость наблюдаются в Азии, можно предположить их азиатское происхождение. Штаммы, выделенные на территории России, отличаются неоднородной структурой и включают представителей разных групп азиатских штаммов (Рис. 2).

B.garinii s.s., выделенные первоначально из клещей в Екатеринбурге, а затем и в Томске (благодаря использованию системы дифференциации видов до секвенирования) также отличаются сложной структурой, однако, преимущественно близки штаммам, выделенным в Японии (Рис. 2). В целом, для этого вида характерна наиболее высокая степень генетической гетерогенности, при которой одной линии могут принадлежать штаммы, выделенные как в Европе, так и в Азии.

Так как природные очаги инфекций являются многокомпонентными системами, включающими в себя возбудителя, переносчика (клещ) и резервуар инфекции – позвоночных прокормителей клещей, совокупность их взаимоотношений затрудняет понимание процессов распространения возбудителей. Наши данные подтверждают широко распространенную гипотезу, согласно которой ключевым фактором, влияющим на распространение боррелий, является видовой состав прокормителей клещей, к которым адаптирован конкретный вид. Так, была показана ассоциация *B.afzelii* и *B.bavariensis* с млекопитающими (мелкими грызунами), а *B.garinii* – с птицами [2, 3]. Очевидно, что грызуны имеют гораздо меньшую подвижность по сравнению с птицами, поэтому *B.afzelii* и *B.bavariensis* обладают выраженной географической приуроченностью штаммов, в отличие от *B.garinii*, для которых характерна высокая степень гетерогенности штаммов из одного географического региона вследствие частого обмена между популяциями [8].

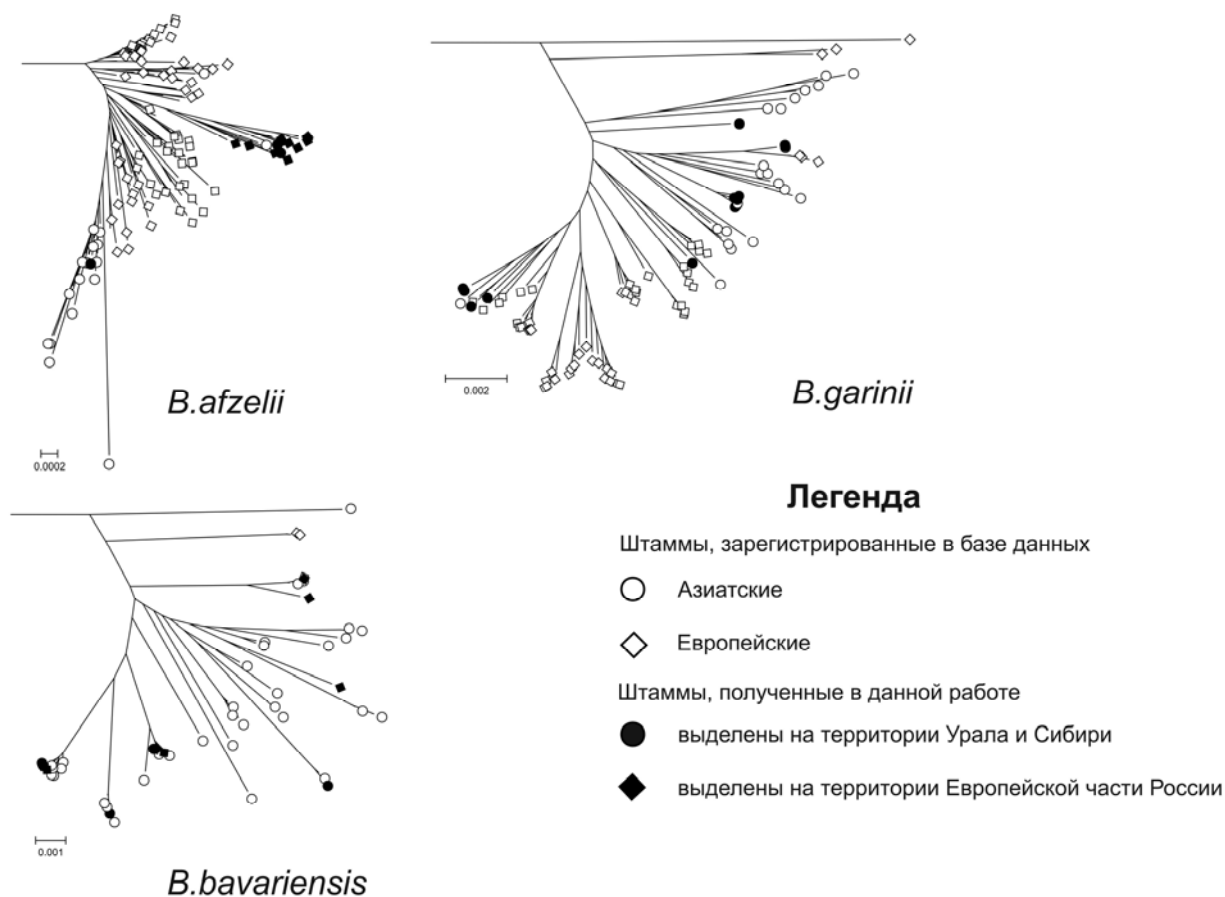


Рис.2. Филогенетические деревья, построенные на основе мультилокусного типирования для трех видов боррелий. Для построения использованы наши последовательности и сиквенс-типы из международной базы данных (длина 4785 н.п.). Деревья построены методом Neighbor-joining в программе MEGA5. Географическая принадлежность штаммов показана согласно легенде.

Помимо трех вышеназванных геновидов, принадлежащих комплексу *B. burgdorferi* s.l., в природных очагах Урала встречается *B. miyamotoi*, относящаяся к группе клещевых возвратных лихорадок (КВЛ). Было показано, что данный геновид может вызывать лихорадочные формы ИКБ [9]. Т.к. известно, что клиническая картина боррелиоза может зависеть от вида возбудителя, большое значение приобретает дифференциальная диагностика геновидов боррелий как в клеще, так и в клиническом материале. Ранее нами была разработана система дифференциации трех основных геновидов боррелий (*B. garinii*, *B. afzelii* и *B. miyamotoi*) путем проведения ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с флуоресцентно мечеными гибридизационными зондами (TaqMan). Однако, недостатком данной системы явилась невозможность дифференциации близких видов *B. garinii* и *B. bavariensis*, что важно для проведения исследований экологических особенностей

боррелий. Поэтому нами был разработан дополнительный набор праймеров и зондов, а также включена стадия типирования этих двух видов (дополнительная реакция ПЦР в реальном времени). Оценка видового разнообразия боррелий улучшенной методикой, позволяющей детектировать четыре геновида, проводилась для одиночных клещей, собранных в сезон 2013 года на территории Пермского края (50 клещей), Свердловской области (489), окрестностях Новосибирска (109) и Томска (182) (Рис.1). На первом этапе клещи были исследованы на предмет наличия боррелий. Для этого проводилась экстракция ДНК клещей, постановка обратной транскрипции и ПЦР – амплификации в режиме реального времени фрагмента гена 16S рРНК согласно методике [7] на амплификаторе ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, USA). Определение видовой принадлежности позитивных на 16S рРНК образцов осуществлялась одновременно в одной пробирке во второй реакции ПЦР-РВ. В качестве мишени были выбраны гены *uvrA* (детекция *B.garinii* и *B.afzelii*) и *glpQ* (ген, присутствующий исключительно в геноме боррелий КВЛ и использующийся в качестве маркера *B.miyamotoi*). Для типирования *B.garinii* и *B.bavariensis* был выбран ген *nifS*. Установление наличия того или иного геновида осуществлялось по нарастанию флуоресценции соответствующего красителя; микст-зараженность клещей оценивали по наличию нескольких геновидов в одной пробе.

Процент негенотипируемых (позитивных по 16S рРНК, но отрицательных по всем видоспецифическим маркерам) проб составил в среднем около 10% от позитивных образцов. Их наличие может быть связано либо с низкой концентрацией ДНК боррелий, которая не может быть детектирована данным методом, либо с неполной специфичностью используемых праймеров и зондов. Данная ситуация требует дальнейшего исследования и совершенствования системы дифференцировки с целью более полного выявления всех геновидов.

Соотношение геновидов боррелий в популяциях клещей разных территорий может существенно отличаться (Рис.3). В целом, процент микст-инфицированных клещей составил около 6% от всех образцов.

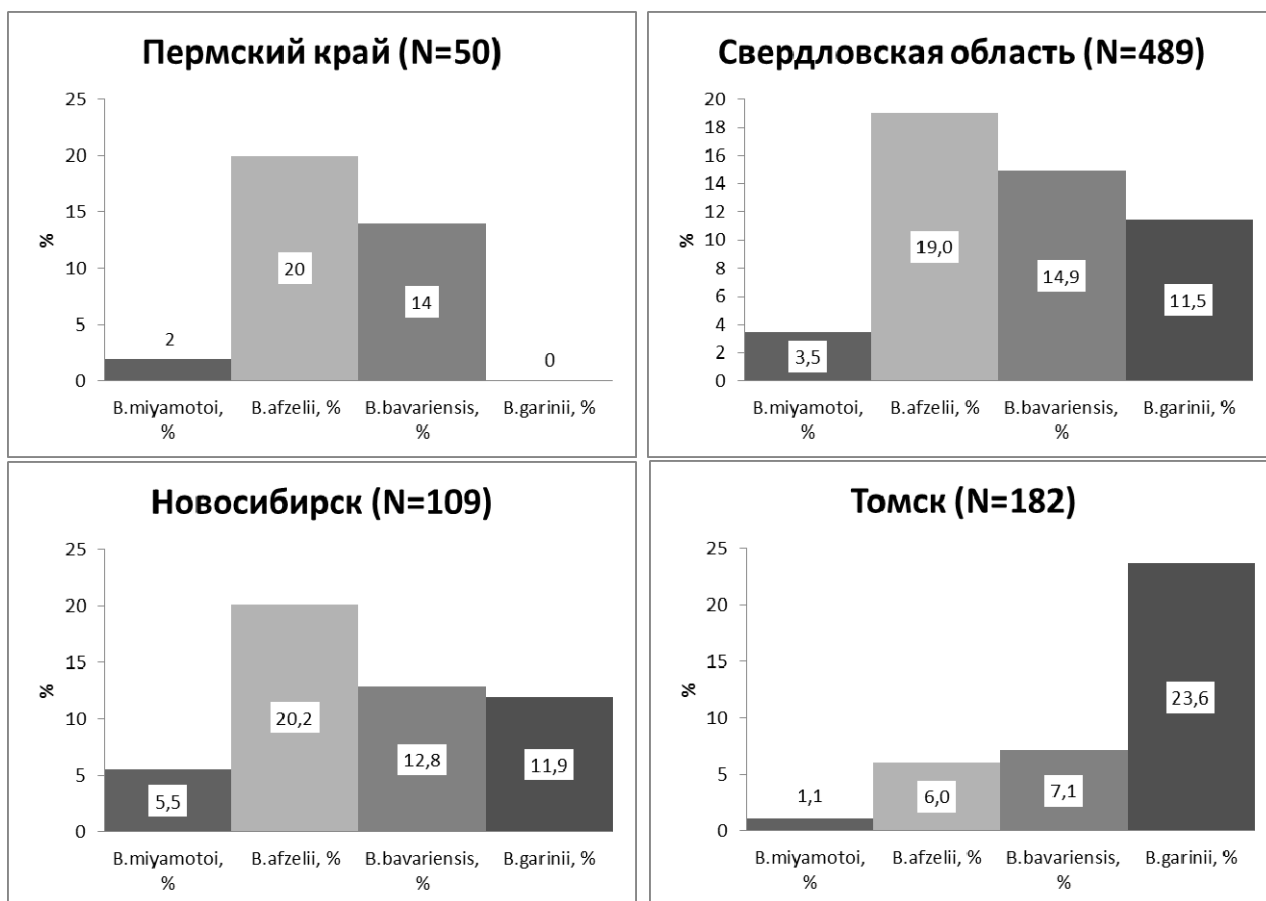


Рис.3. Процентное соотношение геновидов боррелий, циркулирующих в природных очагах на исследованных территориях.

Встречаемость *B. miyamotoi*, выявленная в настоящем исследовании, составила в среднем 3%, что согласуется с ранее полученными данными [1]. При этом сравнение встречаемости видов *B. burgdorferi* s.l. не выявило существенных различий, за исключением отсутствия *B. garinii* в Пермском крае и её высокого содержания в популяции клещей в Томской области (Рис.3). Причина этого явления неясна, однако известно, что различия видового состава могут быть обусловлены биотопическими особенностями, в том числе определяться видовой структурой резервуарных хозяев – грызунов и птиц. В связи с этим мы проанализировали частоту встречаемости различных видов в одном клеще и выявили, что *B. bavariensis* чаще встречается в ассоциации с *B. afzelii* (оба вида адаптированы к грызунам), в то время как доля сочетаний *B. bavariensis* + *B. garinii* s.s. не превышала 5% от положительных образцов. Вероятно, этот факт может служить следствием их адаптации к разным позвоночным хозяевам (птицы и грызуны) и относительно независимой циркуляции в природных очагах.

Применение разработанной ПЦР-РВ системы дифференцировки боррелий позволило нам значительно повысить эффективность проводимого мультилокусного

сиквенс-типирования за счет 1) элиминации смешанных образцов, непригодных для проведения MLST; 2) возможности выбора интересующего вида боррелий. В частности, в данной работе нам удалось провести селективное типирование *B.garinii*.

Заключение

В настоящем исследовании впервые в России была применена схема мультилокусного типирования боррелий – возбудителей ИКБ, что позволило установить принадлежность местных штаммов к филогенетическим группам в масштабах всего ареала. Применение этого метода изучения филогении и эволюции боррелий уточняет и дополняет существующие классификации, а унифицированная схема исследования и созданные электронные ресурсы могут послужить основой для глобального сотрудничества ученых в изучении эпидемиологии боррелиозов.

Применение методов предварительной дифференциации боррелий до этапа амплификации требуемых мишеней позволяет существенно снизить стоимость и эффективность анализа за счет элиминации смешанных образцов и возможности выбора интересующих видов. Кроме того, применение такой системы позволяет по-новому оценить соотношение видов боррелий, циркулирующих в природных очагах, а также частоту встречаемости смешанных инфекций. В дальнейшем мы планируем продолжить работу как по видовой дифференциации боррелий в природных очагах разных регионов России, так и по изучению их генетического разнообразия, что необходимо для понимания процессов эволюции и распространения боррелий по ареалу.

Материалы исследовательской работы были представлены в следующих публикациях:

1) Kovalev S. Y., Mukhacheva T. A. Clusterons as a tool for monitoring populations of tick-borne encephalitis virus // J. Med. Virol. - 2013. DOI: 10.1002/jmv.23732.

2) Мухачева Т.А., Ковалев С.Ю. *Borrelia miyamotoi* в клещах на территории Среднего Урала и Западной Сибири // Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций: материалы междунар. конф. (Санкт-Петербург, 5-7 июня) - СПб: Инфекция и иммунитет. - 2013. - Т. 3, № 2. - С. 156.

3) Мухачева Т.А., Ковалев С.Ю. Оценка разнообразия боррелий в клещах на территории Урала и Западной Сибири методом RT-PCR // Актуальные проблемы клещевого энцефалита: материалы рос. конф. с междунар. участием (Москва, 8-10 октября) - М.: Медицинская вирусология. - 2013. - Т. XXVII, №1. - С. 65.

Список использованных источников

1. Карань, Л. С. Применение ПЦР в режиме реального времени для диагностики различных клещевых инфекций // Журнал микробиологии. - 2010. - № 3. - С. 72-77.
2. Fomenko, N. V. et al. Detection of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes persulcatus* ticks in Russia // Entomological Review. - 2010. - V. 90. - № 8. - P. 1088-1094.
3. Heylen, D. et al. Songbirds as general transmitters but selective amplifiers of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genotypes in *Ixodes ricinus* ticks // Environ Microbiol. - 2013. DOI: 10.1111/1462-2920.12304.
4. Kurtenbach, K. et al. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-the key role of host complement // Trends Microbiol. - 2002. - V. 10. - № 2. - P. 74-79.
5. Margos, G. et al. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi* // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2008. - V. 105. - № 25. - P. 8730-8735.
6. Margos, G. et al. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes // Appl Environ Microbiol. - 2009. - V. 75. - № 16. - P. 5410-5416.
7. Margos, G. et al. *Borrelia bavariensis* sp.nov. is widely distributed in Europe and Asia // Int J Syst Evol Microbiol. - 2013. DOI: 10.1099/ijs.0.052001-0.
8. Ornstein, K., Barbour, A. G. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay of *Borrelia burgdorferi* 16S rRNA for highly sensitive quantification of pathogen load in a vector // Vector Borne Zoonotic Dis. - 2006. - V. 6. - № 1. - P. 103-112.
9. Vollmer, S. A. et al. Host migration impacts on the phylogeography of Lyme Borreliosis spirochaete species in Europe // Environ Microbiol. - 2011. - V. 13. - № 1. - P. 184-192.